469—475 6832(17)

动 物 学 研 究 1996, 17 (4): 469—475 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

昆明水源水和自来水水质致突变性及化学背景值*

Ⅱ. 蝌蚪红细胞微核和 CHO 细胞染色体畸变及 SCE 试验

王蕊芳 贺维顺 吴世芳
(中国科学院昆明动物研究所 昆明 650223)

R123.1

袁 棠 王 欣 杨琼芝 李宝云 许慧明 R114
(昆明市自来水总公司 昆明 650051) (昆明市卫生防疫站 昆明 650034)

A

摘要 本文研究的目的是以蝌蚪微核及 CHO 培养细胞染色体畸变(CA)及姐妹染色单体交换(SCE)为指示器，研究昆明市各水厂自来水和它们源水的潜在致突变性。结果表明：①各水厂自来水及它们的源水诱发蝌蚪微核率，除 Y-水厂自来水外都有显著性差异。②CA 率的结果：各水厂自来水及源水和对照组除了 W-水厂自来水外，都没有显著性差异。③SCE 率：高浓度组(0.0625 L/ml)的滇池源水及 W-水厂自来水和低浓度组(0.03125 L/ml)的 W-水厂自来水同对照组相比，有极显著性差异。低浓度组滇池源水和高浓度组的 E-，S-水厂自来水有显著性差异。

水质分析

关键词 水质污染，蝌蚪微核试验，CHO 细胞，染色体畸变，姐妹染色单体交换 卫生毒理

水是人类最宝贵的资源，是人类社会赖以生存的物质基础。关于水污染大量研究结果表明，肿瘤发病率和死亡率最高的一些地区，都是水污染最为严重的地区。由此，水源水和饮用水中的致突变物和/或致癌物的问题越来越受到人们极大关注，从而推动了国内外学者对水体中微量污染物与人群健康潜在影响的诸多研究。

国内外有关水污染致突变性研究常采用的技术路线有：鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体回复突变试验(Loper, 1980; Vartiainen 等, 1986; 王文基等, 1990; 黄志丹等, 1992; 徐凤丹等, 1993; 莫自耀等, 1993)、水生脊椎动物体内微核(Hooftman 等, 1981; Manna 等, 1985; 贺维顺等, 1990)、体外微核试验(Al-Sabti, 1994)、染色体畸变分析(Hooftman 等, 1981; Wilcox 等, 1986)、姐妹染色单体交换(Hooftman 等, 1981; 秦钰慧等, 1985; 王文基等, 1990; 王宏等, 1991)等。本项研究为了对昆明市居民饮水水源水及出厂自来水水质作出安全性评价，我们选用灵敏度较高的水生脊椎动物蝌蚪微核试验，水样品浓缩提取物体外诱发哺乳动物染色体畸变和姐妹染色单体交换试验，评价昆明饮水源水及其出厂自来水水质的致突变性，为昆明市数百万居民饮水安全性提供

* 本课题得到云南省科学技术委员会应用基础研究基金资助和昆明市自来水总公司的支持
本文 1995 年 5 月 10 日收到，同年 12 月 5 日修回

实验依据。

1 材料和方法

1.1 蟾蜍蝌蚪体内红细胞微核试验

1.1.1 实验动物 实验动物采用华西大蟾蜍(*Bufo andrewsi*)变态前的蝌蚪。于1993年1月份采自昆明市西郊花红洞附近的水塘，体重约0.4—0.5 g，在开始染毒前4周，把蝌蚪饲养在实验室经暴气后的饮水中。每日上午投入磨细的鱼饵料或熟蛋黄1次，每周换水两次，实验前在实验室至少饲养1个月。

1.1.2 动物暴露处理 用于实验的蝌蚪分别送到Y、E、S、W-水厂，并在滇池，松华坝水库源水，花红洞地下对照水及各自来水厂的自来水中暴露21天。定有专人负责饲养管理。每个实验组至少饲养30只蝌蚪。于21天结束暴露时杀死动物制片。

1.1.3 微核标本制备 处死动物前6 h将蝌蚪转移到清洁的水中。制片时取出蝌蚪摘取心脏，取血涂片，立即用电热吹风器吹干，以甲醇固定，10%Giemsa(pH = 6.80)染色。

1.1.4 标本观察 华西大蟾蜍蝌蚪红细胞在脊椎动物中是属大型血球之一，经Giemsa染色，在显微镜下细胞质和细胞核的结构极为清晰。观察指标包括微核在内的各种类型的核异常，常见的有：①微核(micronucleus)；②核质外凸(nuclear protrusion)；③核内凹(nuclear concavity)；④核固缩(karyopyknosis)；⑤核碎裂(karyorrhexis)；⑥核变形(irregularnucleus)；⑦核内空泡(nuclear vacuole)及无丝分裂(amitosis)等。在本实验中、为避免人为的赝像，在统计处理时仅以微核率为统计终点。每组观察8—10只动物，每只动物平均观察2000个细胞，记录带有微核的细胞数。观察结果以千分率(‰)表示。

1.2 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞体外培养染色体畸变，姐妹染色单体交换试验

1.2.1 水样采集和水样浓缩提取物制备 滇池和松华坝水源水和各自来水厂出厂水采集于1993年4月，取样40 L，源水经自然沉淀过滤。各种水样经大孔径网状树脂XAD-2装入吸附。自然干燥后以丙酮-甲醇(3：7)洗脱树脂上的有机污染物，用低于60℃电热风下吹干，溶解于二甲亚砜(DMSO)有机溶剂中，待用。

1.2.2 细胞培养 实验用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，培养在10 ml含有15%小牛血清，100 u／ml青霉素和100 μg／ml链霉素的199培养液中(pH为7.2—7.4)。培养温度为37℃。

1.2.3 细胞染毒 CHO细胞传代后，即加入8 μg／ml的5-溴脱氧尿苷(BrdU)于10 ml培养液中，放入37℃培养箱中培养15 h左右，待细胞长成单层，倾去培养液，以不含小牛血清的199培养液洗涤细胞两次，加入10 ml不含小牛血清的199培养液，同时加入水样浓缩提取物(高剂量组最终浓度为0.06250 L／ml；低剂量组最终浓度为0.03125 L／ml)，实验细胞在受试物的参与下，在37℃培养箱中孵育2 h，倒去受试物，以37℃预温的199培养液轻洗细胞。然后加入全成份培养液和8 μg／ml的BrdU继续培养，收获细胞前4 h加入最终浓度为0.67 μg／ml的秋水仙素溶液，阻止中期细胞。以0.25%胰酶消化、收集细胞，常规空气干燥法制片。

1.2.4 姐妹染色单体分化染色用紫外线照射加Giemsa染色法，玻片干燥后镜检。

1.2.5 镜检 在显微镜的100倍油镜下检查各种水样浓缩提取物处理的细胞染色体畸变和姐妹染色单体交换。

2 结果和讨论

2.1 蝌蚪红细胞微核试验

饮水水源水及各水厂自来水饲养蝌蚪 21 天后红细胞出现的微核率：以花红洞地下无污染地下水养的蝌蚪作为对照组，其微核率为 5.88‰；松华坝水源水组微核率为 19.54‰；Y-水厂自来水组为 7.41‰；E-水厂自来水组为 12.74‰；S-水厂自来水组为 9.35‰；滇池源水组为 16.20‰；W-水厂自来水组为 10.20‰。滇池及松华坝源水及各水厂自来水与花红洞地下水对照组相比，经统计学处理，除 Y-水厂外，其余各组均有显著性差异(见表 1)。

表 1　昆明市各水厂自来水和它们的源水水质对蟾蜍蝌蚪微核率的影响

Tab. 1　Effects of each water plant tap water and their source water in Kunming on frequency of erythrocyte micronuclens of tadpole (*Bufo andrewsi*)

水样品	暴露时间(天)	观察动物数	观察细胞数	微核细胞数	微核千分率(‰)	其中多微核细胞数				χ^2 值	P 值
						2 微核	3 微核	4 微核	5+微核		
滇池水源水	21	14	21292	345	16.20	22	5	2	1	85.768	<0.001
W-水厂自来水	21	11	18338	187	10.20	9	1			19.762	<0.001
松华坝源水	21	12	22312	436	19.54	43	24	13	14	130.852	<0.001
Y-水厂自来水	21	11	17150	127	7.41	2				2.783	
E-水厂自来水	21	15	30542	389	12.74	36	14	3		49.369	<0.001
S-水厂自来水	21	12	17549	164	9.35	16	6		3	13.158	<0.001
花红洞对照水	21	9	17192	101	5.88	8	1	1			

微核试验(micronucleus test)是检查环境污染物对细胞遗传物质——染色体损伤效应的一种简便、快速且有效的致突变性筛选方法。目前，微核试验已为一些国际组织如国际经济合作和发展组织(OECD)，国际诱变剂、致癌剂防护委员会(ICPEMC)等推荐为检测致癌剂、诱变剂常用的遗传毒理学方法之一。水体中如果存有致突变和／或致癌作用的污染物，就能引起蝌蚪红细胞中的微核形成，这些微核经 Giemsa 染色后很容易在显微镜下观察到。它们是染色体断片或整条染色体在细胞分裂后期不能移到细胞纺锤体的两极而形成。因此，微核起因于染色体断裂或有丝分裂器的紊乱。致断裂物质和纺锤体抑制剂都能导致微核的数目增高。在正常的饲养条件下，两栖动物的幼体或蝌蚪自发的微核标准值一般是每 1000 个细胞<10。

水环境中污染物诱发蝌蚪红细胞的微核率高低，不仅取决于水体中的致突变物或细胞纺锤体抑制剂活性的强弱，还取决于细胞有丝分裂的旺盛程度和细胞分裂速度。蟾蜍蝌蚪是两栖类动物变态前的幼体阶段，细胞分裂旺盛，在常规的血涂片上，经常可以看到正在分裂的有丝分裂相。因此，用蝌蚪红细胞微核试验，检测水体中的环境污染物时，其灵敏度高于鱼类微核试验。

Jaylet (1986)用乙基磺酸甲酯诱发肋螈(有尾两栖类)幼体微核试验，并同 Hooftman(1982)的工作进行比较。Hooftman 用质量浓度为 4×10^{-5} 乙基磺酸甲酯处理东方荫鱼(*Umbra pygmae*)6 周，产生具有微核的细胞仅有 5±2‰，而用 5×10^{-5} 乙基磺酸甲酯，以同样的方式处理肋螈幼体，有微核的细胞率达到 85‰，在 1×10^{-4} 时，其微核率可达到 200‰。

贺维顺等(1990)使用不同浓度的昆明大观河水养殖蝌蚪7天，其微核率随着污水浓度的加大而升高，并有明显的浓度效应关系。两栖动物幼体或蝌蚪用于污水致突变性检测被证明有效，用于饮水检测是否也可行?正如本次实验所示，只要在受试水中延长暴露时间同样有效。

法国Jaylet等(1987)使用肋螈(*Pleurodeles waltl*)幼体的红细胞微核试验检查饮水的致突变性，结果表明这项研究技术对于检查普通水中的致断裂剂是可行的，还可用于在源水处理的不同阶段上，对微量污染物不需要任何预先提取或浓缩就可应用于饮水的质量控制。

蝌蚪或肋螈幼体之所以能有效地对普通饮水不需要任何预先提取或浓缩就可以检测，可能与这些动物本身有很强的富集污染物的能力有关。Grinfeld等(1986)用氚标记强致癌物苯并[a]芘作了肋螈幼体富集试验，肋螈幼体的体内在12 h时富集的苯并[a]芘大于等体积实验水的活性比200倍。

本次实验结果蝌蚪红细胞微核率花红洞地下水对照组为5.88‰，松华坝和滇池源水组微核率分别为19.54‰和16.20‰，松华坝水微核率高于滇池水组。原因可能是水样采集时间恰逢1993年4月份，昆明地区百年不遇的干旱季节，与松华坝水样大量蒸发自然浓缩有关。

2.2 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞染色体畸变(CA)和姐妹染色单体交换(SCE)试验

滇池，松华坝源水及各水厂自来水水样浓缩提取物诱发CHO细胞染色体畸变和姐妹染色单体交换结果见表2及表3。

表2 昆明市源水及自来水浓缩提取物对CHO细胞染色体畸变率的影响

Tab. 2 Effects of different water plants tap water and their source water extracts in Kunming on frequency of chromosomal aberration of CHO cells

水样品	处理 (h)	浓度 (L/ml)	观察细胞数(个)	带有畸变的细胞数(个)	染色体畸变的类型 a	b	c	d	e	f	g
滇池水源水	38	0.06250	100	8	7	1	0	0	0	0	0
	38	0.03125	100	9	5	3	0	0	0	0	1
W-水厂自来水	38	0.06250	100	4	2	0	0	0	0	2	0
	38	0.03125	100	12	5	4	1	1	1	0	0
松华坝水源水	38	0.06250	100	5	2	3	0	0	0	0	0
	38	0.03125	100	3	2	1	0	0	0	0	0
Y-水厂自来水	38	0.06250	100	5	3	0	0	1	1	0	0
	38	0.03125	100	3	2	0	1	0	0	0	0
E-水厂自来水	38	0.06250	100	4	3	1	0	0	0	0	0
	38	0.03125	100	3	1	2	0	0	0	0	0
S-水厂自来水	38	0.06250	100	4	2	1	0	0	0	0	1
	38	0.03125	100	5	4	0	1	0	0	0	0
花红洞对照水	38	0.06250	100	2	1	0	0	0	1	0	0
	38	0.03125	100	2	2	0	0	0	0	0	0
DMSO对照组	38		100	4	2	1	0	0	0	0	1

a. 染色单体断裂；b. 等染色单体断裂；c. 非对称性染色单体互换；d. 对称性染色单体互换；e. 染色体环；f. 双着丝粒染色体；g. 核内复制

2.2.1 染色体畸变(CA)分析 滇池、松华坝源水和各水厂自来水浓缩提取物诱发CHO

细胞染色体畸变试验分两个浓度组，高浓度组最终浓度为 0.0625 L／ml，低浓度组为 0.03125 L／ml。本次试验所选用的浓度是英国水研究中心(Water Research Centre) Wilcox 等(1986)使用的 1 L／ml 浓度的 1／16，仅在这种浓度时，才不致影响 CHO 细胞的正常生长。换言之，滇池，松华坝源水及各水厂自来水水样浓缩提取物对 CHO 细胞的毒性高于英国同水平的 16 倍。0.0625 L／ml 及 0.03125 L／ml 浓度组在培养的 CHO 细胞中都能诱发染色体畸变，大多数畸变类型为染色单体及等染色单体断裂或断片，但是以滇池为源水的 W－水厂样品组除了有染色单体断裂，等染色单体断裂外，还出现了严重损伤型的非对称性染色单体互换、对称性染色单体互换、双着丝粒染色体和染色体环(见表 2)。经样品平均数两个百分率间的 t 检验，仅 W－水厂水组与对照组相比有统计学意义。

表 3　昆明饮水源水及自来水浓缩提取物对 CHO 细胞姐妹染色单体交换率的影响

Tab. 3　Effects of different water plants tap water and their source water extracts in Kunming on frequency of sister chromatid exchange (SCEs) of CHO cells

水样品	处理 (h)	浓度 (L／ml)	观察细胞数(个)	范围	每个细胞的平均 SCE 数 (mean ± S.E.M)	t 值(同 DMSO 相比)
滇池水源水	38	0.06250	50	2—25	9.50 ± 0.68	3.8000**
	38	0.03125	50	3—16	8.08 ± 0.47	2.5320*
W－水厂自来水	38	0.06250	50	3—19	8.68 ± 0.46	3.5757**
	38	0.03125	50	4—19	9.62 ± 0.55	4.6175**
松华坝水库源水	38	0.06250	50	2—12	7.10 ± 0.36	1.0121
	38	0.03125	50	2—16	7.46 ± 0.44	1.5356
Y－水厂自来水	38	0.06250	50	2—15	7.30 ± 0.43	1.2755
	38	0.03125	50	2—17	7.26 ± 0.53	1.0624
E－水厂自来水	38	0.06250	50	1—20	8.44 ± 0.59	2.6933*
	38	0.03125	50	0—16	7.20 ± 0.42	1.1072
S－水厂自来水	38	0.06250	50	1—21	8.08 ± 0.55	2.2615*
	38	0.03125	50	2—14	6.86 ± 0.43	0.4949
花红洞对照水	38	0.06250	50	2—18	6.64 ± 0.42	0.1076
	38	0.03125	50	3—17	7.16 ± 0.45	0.9971
DMSO 溶剂对照	38		50	2—12	6.58 ± 0.36	

* 显著性差异，** 极显著性差异

2.2.2　姐妹染色单体交换(SCE)分析　SCE 分析使用水样浓缩物的浓度同于 CA 分析。所得的结果是滇池水及以滇池水源为源水的 W－水厂自来水的高低浓度两个组 SCE 率与平行对照组相比，经 t 检验，$P<0.01$，相差非常显著。除此以外，E－、S－水厂的高浓度组，$0.05>P>0.01$，亦有显著性差异(见表 3)。SCE 检测水体中的致突变物比 CA 分析更为灵敏。Latt(1974)曾经指出：SCE 技术在检测环境污染物诱变剂和／或致癌剂的灵敏度比染色体畸变分析高出 200 倍。王宏等(1991)研究氯化饮用水致突变性检测方法敏感性试验时指出：体外 CHO 细胞 SCE 试验最为敏感，根据他们的研究结果作者建议，在一般地表水为水源的氯化饮水的致突变性检测中，可首选体外 CHO 细胞 SCE 试验。目前，尽管关于姐妹染色单体交换产生的机理及生物学意义尚不明确，但其结果与致突变，致癌效应高度相关。根据国际诱变剂、致癌剂防护委员会(ICPEMC)对遗传毒物所下的定义："任何一项致突变性试验，不论其遗传终点如何，只要是得出阳性结果，即可认为该受试

物属于致突变物”。SCE技术已被世界广大地区广泛用作快速筛选环境致突变物和致癌物方法之一。

存在于水体中的污染物，其特点是种类多，浓度低。本项研究采用灵敏度高的蟾蜍体内红细胞微核试验，哺乳动物CHO细胞体外SCE分析，测试不同遗传终点，从而确定滇池水源水及以滇池水为源水的自来水质和水浓缩提取物有致突变性。本次研究结果与贺维顺等(1990，1992，1995)，徐凤丹等(1993)关于滇池水源水及以此源水的自来水致突变性研究结果相一致。

致谢 本文实验材料CHO细胞由昆明动物研究所细胞库提供，谨此致谢。

参考文献

王文基，陆寿珍，王爱玲等，1990．黄浦江水中化学污染物分析与生物遗传毒性研究．中国环境科学，10(6)：434—439.

王 宏，刘朝杰，杨在昌等，1991．氯化饮用水致突变性检测方法敏感性的研究．环境与健康杂志，8(3)：107—109.

贺维顺，王蕊芳，1990．蟾蜍(*Bufo bufo andrewsi*)外周红细胞微核和核异常监测水质污染的研究．动物学研究，11(1)：1—6.

贺维顺，王蕊芳，1992．污水和污水土地处理系统中各种水质对华西蟾蜍蝌蚪红细胞微核率的影响．动物学研究，13(3)：275—279.

贺维顺，王蕊芳，吴世芳等，1996．昆明水源水及自来水水质致突变性及化学背景值Ⅰ．Ames试验和水源水及自来水微量有机、无机污染物化学背景值．动物学研究，17(4):421—427.

秦钰慧，郭润荣，周世伟，1985．饮水中有机污染物对CHO细胞SCE的影响．环境科学，6(6)：17—20.

莫自耀，梁晓莉，杜瑛瑛等，1993．广州自来水厂水源水和自来水水样致突变性调查．癌变．畸变．突变，5(6)：32.

徐凤丹，周世伟，宋瑞霞等，1993．我国若干城市饮水的致突变性表征．癌变．畸变．突变，5(6)：23

黄志丹，田世忠，邓南圣等，1992．东湖水及自来水中非挥发性有机污染物的GC-MS鉴定和致突变性研究．见：国家环保局有毒化学品管理办公室《上海环境科学》杂志社编．有毒化学品研究与管理技术．226—230.

Al-Sabti K, 1994. Micronuclei induced by selenium, mercury, methlmercury and their mixtures in binucleated bl-ocked fish erythrocyte cells. *Mutation Res.*, **320**: 157-163

Grinfeld S, Jaylet A, Siboulet R *et al*, 1986. Micronuclei in red blood cells of the newt, pieurodeles waltlafter treatment with benzo[a]pyrene: Dependence on dose, length of exposure, posttreatment time, and uptake of the drug, *Environ. Mutagen*, **8**(1): 41-52.

Hooftman R N, Vink G J, 1981. Cytogenetic effects on the Eastern Mudminnow, *Umbra pugmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo[a]pyrene, and River water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **5**: 261-269

Jaylet A, Deparis P, Ferrier V, 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution, *Mutation Res.*, **164**: 245-257.

Jaylet A, Gauthier L, Fernandez M, 1987. Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltl*) *Mutagenesis*, **2**(3): 211-214.

Latt S A, 1974. Sister chromatid exchangs, indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl Acad Sci. USA* **71**: 3162.

Loper J C. 1980 Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. *Mutation Res.*, **76**: 241–268

Manna G K, Banerjee G, Gupta S, 1985. Micronucleus test in the peripherel erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*. The nucleus, **28**(3): 176–179

Vartiainen T, Liilmatainen A, 1986 High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland. *Mutation Res*, **169**: 29–34

Wilcox P, Williamson S. 1986 Mutagenic activity of concentrated drinking water samples *Environmental Health Perspectives*, **69**: 141–149.

MUTAGENCITY AND BACKGROUND CONTENT CHEMICALS OF WATER QUALITY OF SOURCE WATER AND TAP WATER IN KUNMING

II. The micronucleus test of tadpole erythrocyte and chromosomal aberration and SCEs test of CHO cell

Wang Ruifang　He Weishun　Wu Shifang

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Yuan Tang　Wang Xin　Yang Qiongzhi

(*Kunming Municipal Waterworks Co.*)

Li Baoyun　Xu Huiming

(*Health and Antiepidemic Center of Kunming*)

Abstract

This study is aimed to investigate the potential mutagenicity of tap water and their source water from water plants in Kunming with tadpole micronuclei and chromosomal aberrations (CA) and sister chromatid exchages (SCEs) tests of cultured CHO cells. The results revealed: ① There is an obvious difference on frequency of tadpole micronucleus induced between each water plant tap water and its source water with the exception of Y-water plant tap water. ② The results of CA frequency showed no substantial difference between each water plant tap water and its source water and control group except of low concentration (0.03125 L / ml) group of W-water plant tap water. ③ There is an extremly significant difference between the high concentration groups 0.0625 L / ml (Dianchi Lake source water and W-water plant tap water), and low concentration group (W-water plant tap water through comparison with control group) with SCE frequency. There is a significant difference in low concentration group of Dianchi Lake source water and high concentration group of E-, S-water plant tap water.

Key words　Water pollution, Tadpole micronucleus, CHO cell, CA and SCE